

АНАЛІЗ РОСТУ МІКРОБНИХ ПОПУЛЯЦІЙ ПРИ ВИКОРИСТАННІ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ ВУГЛЕЦЮ

Науменко А.Ю.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, naum.nastia@gmail.com

Abstract

*The study investigates the effect of various carbon sources (glucose, fructose, galactose) on the growth of *Lactobacillus rhamnosus* under submerged cultivation. Statistical analysis confirmed glucose as the most effective substrate for biomass production and growth rate.*

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*, submerged cultivation, carbon source, glucose, growth rate.

Вступ. Глибинне культивування є одним із найефективніших методів вирощування мікроорганізмів для біотехнологічних потреб. У таких умовах створюються сприятливі параметри середовища для оптимального росту та метаболічної активності бактерій. Важливим аспектом є вибір джерела вуглецю, яке безпосередньо впливає на швидкість росту, біомасоутворення та синтез цільових метаболітів.

Рід *Lactobacillus* був запропонований Бейєрінком у 1901 році і включає в себе грампозитивні, ферментативні, факультативно анаеробні та неспороутворюючі мікроорганізми. Рід класифікується за типом *Firmicutes*, клас *Bacilli*, порядок *Lactobacillales*, родина *Lactobacillaceae*, який містить роди *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* та *Pediococcus* [1]. Ці бактерії є важливими моделями мікроорганізмів для метаболічного бродіння, біосинтезу клітинної стінки та досліджень взаємодії мікроб-господар. Крім того, в даний час вони використовуються в багатьох біотехнічних додатках, наприклад, як стартові культури, як пробіотики, у виробництві біопластиків та як носії вакцин, підкреслюючи їх високу комерційну цінність [2]. Група *Lactobacillus casei*, що включає вид *Lactobacillus rhamnosus*, є однією з найбільш економічно цікавих клад роду *Lactobacillus*. Комерційно ці мікроби використовуються в ферментованих молочних продуктах або харчових добавках, спрямованих на шлунково-кишковий тракт [3–5] та вагінальний тракт [6]. Інтерес також зростає до їх застосування в інших рецептурах продуктів, орієнтованих на різні ніші людського та тваринного організму. Наприклад, недостатньо вивіданою нішею для місцевого застосування пробіотиків є (верхні) дихальні шляхи та пов'язані з ними захворювання [7].

Метою даної тези є дослідження впливу різних джерел вуглецю (глюкоза, фруктоза, галактоза) на ріст та біосинтетичну активність *Lactobacillus rhamnosus* в умовах глибинного культивування шляхом порівняння ростових показників та статистичної обробки отриманих результатів. Для досягнення мети було визначено основні біотехнологічні параметри росту, проведено аналіз варіативності вибірок і виявлено оптимальне джерело вуглецю для підвищення ефективності культивування. Особливу увагу приділено статистичному обґрунтуванню достовірності отриманих результатів.

Матеріали та методи. В ході виконання дослідження були використані наступні прилади: термостат, мікроскоп, стерильні піпетки, колби з поживним середовищем МРС, пальник, фенолфталеїн, розчин 0,1 N NaOH, дистильована вода. Для засіву було використано культуру молочнокислих бактерій, вирощену на рідкому поживному середовищі МРС, складу (г/дм³): глюкоза – 20; пептон – 10,0; м'ясна вода – 100; дріжджовий екстракт – 10; ацетат натрію – 5; MgSO₄ – 0,2; MnSO₄ – 0,05. Засів було проведено в асептичних умовах, вносячи мікробну суспензію у колбу з поживним середовищем у кількості 5 % від його об'єму. Засіяні колби було вміщено у термостат при 37 °С і культивовано впродовж 48 годин. Після чого у колбу було відібрано піпеткою 5 см³ культуральної рідини, додано 3–4 краплі фенолфталеїну і протитровано 0,1 N NaOH до зміни забарвлення на персиковий колір. Вміст молочної кислоти (C) було визначено за формулою:

$$C = \frac{V \cdot F}{5} \cdot 100\%,$$

де V – об'єм 0,1 N NaOH, що використано на титрування, см³; F – фактор луку за молочною кислотою, 0,0075 (1 см³ 0,1N NaOH відповідає 0,0075 % молочної кислоти).

Визначені показники було використано для розрахунку параметрів процесів росту та накопичення цільового продукту на досліджуваних варіантах поживних середовищ. Зокрема продуктивність культури (Π) було розраховано за наступною формулою:

$$\Pi = \frac{C_{\text{м.к.}} \cdot V_{\text{к.р.}}}{X},$$

де $C_{\text{м.к.}}$ – концентрація молочної кислоти, мг/см³; $V_{\text{к.р.}}$ – об'єм культуральної рідини, см³; X – кількість біомаси, мг.

Результати та обговорення. У ході роботи було встановлено, що використання різних джерел вуглецю має суттєвий вплив на ростові показники *Lactobacillus rhamnosus* при глибинному культивуванні, що продемонстровано на рисунку 1. Найвищі значення продуктивності культури спостерігалися у середовищі з глюкозою (середнє значення – 21,33 мг/мг), тоді як для фруктози та галактози ці показники були значно нижчими – відповідно 1,23 мг/мг та 3,09 мг/мг.

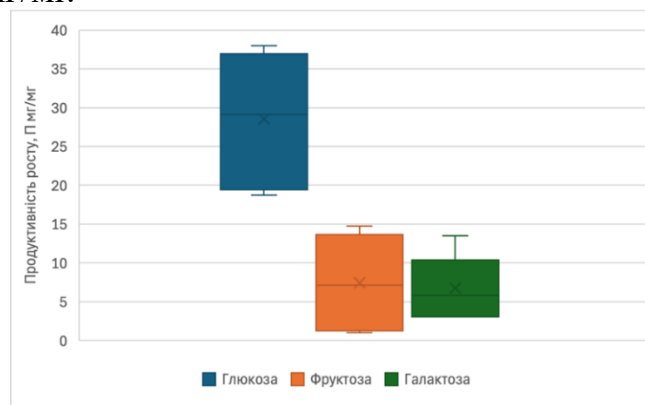


Рис. 1. Діаграма розмаху ростових показників *Lactobacillus rhamnosus* у середовищах з глюкозою, фруктозою та галактозою.

Для кожного варіанту дослідження дані були впорядковані у порядку зростання, розраховано основні статистики вибірок – середнє, медіану, дисперсію та стандартне відхилення. Для виявлення та виключення грубих похибок у вибірках було використано критерій Граббса на 95% рівні довіри. Для порівняння груп застосовано t-критерій Стюдента для незалежних малих вибірок. Результати показали, що різниця між продуктивністю культури у середовищі з глюкозою та фруктозою є статистично значущою ($p = 5,34 \times 10^{-3} < 0,05$), як і різниця між глюкозою та галактозою ($p = 6,59 \times 10^{-3} < 0,05$).

Таким чином, на 95 % рівні довіри встановлено, що глюкоза є найефективнішим джерелом вуглецю для росту *Lactobacillus rhamnosus* у межах проведеного експерименту. Для наочного представлення отриманих результатів побудовано діаграму розмаху, яка демонструє медіану і варіативність вибірок. Дані для середовища з глюкозою виявилися найбільш стабільними та однорідними порівняно з іншими варіантами, що ще раз підтверджує ефективність цього джерела вуглецю.

Висновки. Отримані результати свідчать про статистично значущу різницю в ростових показниках *Lactobacillus rhamnosus* при використанні різних джерел вуглецю. Найвищі значення продуктивності та швидкості росту були зафіксовані у варіантах з глюкозою. Проведений t-критерій Стюдента для незалежних малих вибірок підтвердив наявність значущої різниці між глюкозою та фруктозою ($p = 5,34 \times 10^{-3} < 0,05$), а також між глюкозою та галактозою ($p = 6,59 \times 10^{-3} < 0,05$) на 95 % рівні довіри. Таким чином, глюкоза визначена як найбільш ефективне джерело вуглецю для глибинного культивування *L. rhamnosus* і може бути рекомендована для використання в біотехнологічних виробництвах як оптимальний компонент живильного середовища.

Список використаної літератури:

1. Family V. *Leuconostocaceae* fam. nov. / K. H. Schleifer et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2009. Vol. 3, no. 2. P. 624.
2. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. / Z. Sun et al. *Nature Communications*. 2015. Vol. 6, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/ncomms9322>.
3. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. / H. Toh, K. Oshima, A. Nakano, M. Takahata, M. Murakami, T. Takaki, H. Nishiyama, S. Igimi, M. Hattori, H. Morita et al. *Public Library of Science*. 2013. Vol. 8, no. 10, URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075073>.
4. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. / E. Stefanovic, G. Fitzgerald, O. McAuliffe. et al. *Food Microbiology*. 2017. Vol. 61, P. 33–49. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>.
5. High resolution melting analysis (HRM) as a new tool for the identification of species belonging to the *Lactobacillus casei* group and comparison with species-specific PCRs and multiplex PCR. / L. Iacumin, F. Ginaldi, M. Manzano, V. Anastasi, A. Reale, T. Zotta, F. Rossi, R. Coppola, G. Comi et al. *Food Microbiology*. 2015. Vol. 46, P. 357–367. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.007>.
6. The development of probiotics for women's health. / G. Reid et al. *Canadian Journal of Microbiology*. 2017. Vol. 63, no. 4. P. 269–277. URL: <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0733>.
7. Novel microbiome-based therapeutics for chronic rhinosinusitis. / E. K. Cope, S. V. Lynch et al. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2015. Vol. 15, no. 3. URL: <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0504-y>.